

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

#2
8-6-01



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 6月 2日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-165473

出 願 人

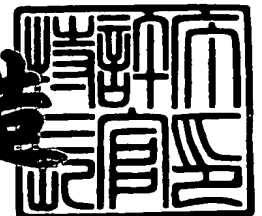
Applicant(s):

昭和電工株式会社

2001年 4月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3033217

【書類名】 特許願

【整理番号】 11H120139

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C08F 26/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区扇町 5 番 1 号 昭和電工株式会社
川崎事業所内

【氏名】 高橋 龍二

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区扇町 5 番 1 号 昭和電工株式会社
内

【氏名】 鈴木 廣志

【特許出願人】

【識別番号】 000002004

【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

【識別番号】 100094237

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢口 平

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010227

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9702281

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固相抽出用充填剤及び固相抽出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】疎水性単量体（A）と親水性単量体（B）を共重合することにより得られる合成高分子に化学的修飾によりイオン交換性基を導入してなる固相抽出用充填剤。

【請求項 2】疎水性単量体（A）として、芳香族ジビニル化合物を単量体総量に対して 3 0 質量%以上含むことを特徴とする請求項 1 に記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 3】親水性単量体（B）として、N-ビニルカルボン酸アミドを、単量体総量に対して 5 ～ 6 0 質量%含むことを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 4】N-ビニルカルボン酸アミドが、N-ビニル-2-ピロリドンまたはN-ビニルアセトアミドである請求項 3 に記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 5】親水性単量体（B）として、水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルを単量体総量に対して 1 0 質量%以上含むことを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 6】水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルがグリセリンジメタクリレートである請求項 5 に記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 7】イオン交換基が共有結合により導入されてなることを特徴とする請求項 1 ないし 6 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 8】共有結合されたイオン交換基がスルホ基または 4 級アンモニウム基であることを特徴とする請求項 1 ないし 7 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 9】共有結合されたイオン交換基が、充填剤 1 乾燥グラムに対して 5 μ 当量以上あることを特徴とする請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 1 0】充填装置に充填して用いることを特徴とする請求項 1 ないし 9 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 1 1】 充填装置が、カラム、カートリッジ、またはリザーバーである請求項 1 0 に記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 1 2】 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする請求項 1 ないし 1 1 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 1 3】 平均粒子径が、1 ～ 2 0 0 μ m である請求項 1 ないし 1 2 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【請求項 1 4】 請求項 1 ないし 1 3 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を、カラムスイッチング法を用いる固相抽出に使用することを特徴とする方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 ないし 1 3 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を充填してなる固相抽出用カラム。

【請求項 1 6】 請求項 1 ないし 1 3 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を充填してなる固相抽出用カートリッジ。

【請求項 1 7】 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする請求項 1 5 に記載の固相抽出用カラム。

【請求項 1 8】 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする請求項 1 6 に記載の固相抽出用カートリッジ。

【請求項 1 9】 請求項 1 5 または 1 7 に記載の固相抽出用カラムを用いることを特徴とする環境、医薬または生体関連試料の固相抽出方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 6 または 1 8 に記載の固相抽出用カートリッジを用いることを特徴とする環境、医薬または生体関連試料の固相抽出方法。

【請求項 2 1】 血清中の薬物試料の同定または定量を目的とした請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】 血清中の薬物試料の同定または定量を目的とした請求項 2 0 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、粒子内に疎水性部位とイオン交換性部位を有する固相抽出用充填、固相抽出方法、それを用いた充填装置及びそれを用いた試料の処理方法に関する

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

従来、液体中からの試料の抽出には、液-液抽出法が多く用いられてきたが、作業の煩雑さ、溶媒を多量に使用する、さらには使用する溶媒が環境、人体に対する影響が大きい等の問題点があった。現在では、合成法の発達に伴い、シリカ系及び合成高分子系多孔性粒子を用いた、作業が簡単で溶媒の使用量も少なく自動化により多量の試料を処理することが出来る固相抽出法が用いられるようになってきた。

【 0 0 0 3 】

固相抽出に用いられる充填剤としては、無機系基材のものとして、シリカゲルの表面をオクタデシル基等で化学修飾し充填剤表面を疎水性にした化学結合型シリカゲル、有機系基材のものとして、スチレン-ジビニルベンゼンに代表される合成高分子系が用いられているがこれらの充填剤は、充填剤の持つ疎水性部分と試料の疎水性部分との疎水性相互作用を利用したものであり、イオン性物質の前処理操作には不適當であった。

【 0 0 0 4 】

従って、イオン性物質の固相抽出による前処理操作には、イオン交換樹脂が用いられていたが、そのイオン交換樹脂はシリカゲルまたは親水性合成高分子の表面にイオン交換基を導入したもの、さらにはイオン交換基を導入することで基材樹脂の性質が著しく親水性に変化することで、充填剤と試料との相互作用はイオン交換作用のみが利用されているに過ぎない。

【 0 0 0 5 】

このように従来の固相抽出用充填剤の充填剤粒子は疎水性相互作用あるいはイオン交換作用が各々単独で利用され、異なる性質を併せ持つ固相抽出用充填剤粒子の検討は十分に行われていなかった。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、従来の疎水性相互作用あるいはイオン交換作用を単独で持つ各々の

固相抽出用充填剤を考察し、疎水性部位とイオン交換性部位を粒子内に併せ持つ充填剤を検討し優れた性能の充填剤を得ることを目的とする。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を続けた結果、粒子内の疎水性部位を損なうことなくイオン交換性部位を導入し両性質を併せ持つことにより、疎水性物質とイオン性物質の試料回収率に優れた固相抽出用充填剤となることを見出し本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 8 】

すなわち本発明は、以下の事項に関する。

〔 1 〕 疎水性単量体 (A) と親水性単量体 (B) を共重合することにより得られる合成高分子に化学的修飾によりイオン交換性基を導入してなる固相抽出用充填剤。

〔 2 〕 疎水性単量体 (A) として、芳香族ジビニル化合物を単量体総量に対して 3 0 質量 % 以上含むことを特徴とする上記〔 1 〕に記載の固相抽出用充填剤。

〔 3 〕 親水性単量体 (B) として、 N - ビニルカルボン酸アミドを、単量体総量に対して 5 ～ 6 0 質量 % 含むことを特徴とする上記〔 1 〕または〔 2 〕に記載の固相抽出用充填剤。

【 0 0 0 9 】

〔 4 〕 N - ビニルカルボン酸アミドが、 N - ビニル - 2 - ピロリドンまたは N - ビニルアセトアミドである上記〔 3 〕に記載の固相抽出用充填剤。

〔 5 〕 親水性単量体 (B) として、水酸基を持つ多価アルコールの (メタ) アクリル酸エステルを単量体総量に対して 1 0 質量 % 以上含むことを特徴とする上記〔 1 〕ないし〔 4 〕のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 6 〕 水酸基を持つ多価アルコールの (メタ) アクリル酸エステルがグリセリンジメタクリレートである上記〔 5 〕に記載の固相抽出用充填剤。

〔 7 〕 イオン交換基が共有結合により導入されてなることを特徴とする上記〔 1 〕ないし〔 6 〕のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

【 0 0 1 0 】

〔 8 〕 共有結合されたイオン交換基がスルホ基または 4 級アンモニウム基であることを特徴とする上記〔 1 〕 ないし〔 7 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 9 〕 共有結合されたイオン交換基が、充填剤 1 乾燥グラムに対して 5 μ 当量以上あることを特徴とする上記〔 1 〕 ないし〔 8 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 1 0 〕 充填装置に充填して用いることを特徴とする上記〔 1 〕 ないし〔 9 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 1 1 〕 充填装置が、カラム、カートリッジ、またはリザーバーである上記〔 1 0 〕 に記載の固相抽出用充填剤。

【 0 0 1 1 】

〔 1 2 〕 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする上記〔 1 〕 ないし〔 1 1 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 1 3 〕 平均粒子径が、1 ～ 2 0 0 μ m である上記〔 1 〕 ないし〔 1 2 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤。

〔 1 4 〕 上記〔 1 〕 ないし〔 1 3 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を、カラムスイッチング法を用いる固相抽出に使用することを特徴とする方法。

〔 1 5 〕 上記〔 1 〕 ないし〔 1 3 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を充填してなる固相抽出用カラム。

【 0 0 1 2 】

〔 1 6 〕 上記〔 1 〕 ないし〔 1 3 〕 のいずれかに記載の固相抽出用充填剤を充填してなる固相抽出用カートリッジ。

〔 1 7 〕 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする上記〔 1 5 〕 に記載の固相抽出用カラム。

〔 1 8 〕 目的成分の濃縮及び／または夾雑物の除去に使用することを特徴とする上記〔 1 6 〕 に記載の固相抽出用カートリッジ。

〔 1 9 〕 上記〔 1 5 〕 または〔 1 7 〕 に記載の固相抽出用カラムを用いることを特徴とする環境、医薬または生体関連試料の固相抽出方法。

【 0 0 1 3 】

〔20〕上記〔16〕または〔18〕に記載の固相抽出用カートリッジを用いることを特徴とする環境、医薬または生体関連試料の固相抽出方法。

〔21〕血清中の薬物試料の同定または定量を目的とした上記〔19〕に記載の方法。

〔22〕血清中の薬物試料の同定または定量を目的とした上記〔20〕に記載の方法。

【0014】

【発明実施の形態】

以下、本発明の実施の形態をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

本発明における固相抽出用充填剤は、疎水性部位とイオン交換性基を併せ持つ粒子である。前記粒子は無機系または有機系の基材に限定されないが、大量合成の容易さ、疎水的性質発現の容易さ、更にはイオン交換性基導入の容易さ等を考慮すると、有機系基材の合成高分子系固相抽出用充填剤が好ましく、例えばポリスチレンージビニルベンゼン系；ポリアクリレート、グリシジルメタアクリレート、グリセリンジメタクリレートなどのポリ（メタ）アクリレート系及びこれらの各種共重合体などが挙げられる。

【0015】

本発明において固相抽出用充填剤は、少なくとも疎水性単量体（A）を含む単量体を重合して得られた粒子にイオン交換性基が導入されたものであり、望ましくは、疎水性単量体（A）及び親水性単量体（B）を共重合して得られた粒子の疎水的性質を損なうことの無いように、親水性単量体の部位にイオン交換基が共有結合されたものである。

【0016】

本発明において疎水性単量体（A）としては、使用される単量体と重合するものであれば特に限定はなく、スチレン、メチルスチレン、クロロメチルスチレン、ブトキシスチレンのようなビニル基を有する芳香族化合物；ジビニルベンゼン、ジビニルトルエン、ジビニルキシレン、ジビニルナフタレンなどの2個以上のビニル基を有する芳香族化合物；エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、

ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、プロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリプロピレングリコールジ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタントリ（メタ）アクリレート、テトラメチロールメタンテトラ（メタ）アクリレート等の多価アルコールポリ（メタ）アクリル酸エステル等が挙げられる。

【 0 0 1 7 】

本発明における疎水性単量体（A）としては生成した粒子の膨潤度を考慮すると、2個以上のビニル基を有するものが好ましく、さらに疎水性を考慮すると2個以上のビニル基を有する芳香族ジビニル化合物がより好ましい。これら2個以上のビニル基を有する芳香族化合物の中でも入手の容易さの点からジビニルベンゼンを用いるのが好ましく、生成した粒子の膨潤度、疎水性を考慮すると単量体総量に対して30質量%以上、好ましくは45質量%以上含有することが好ましい。芳香族ジビニル化合物が30%以下だと、疎水的性質が損なわれるため好ましくない。

【 0 0 1 8 】

本発明において用いられるジビニルベンゼン等の2個以上のビニル基を有する芳香族化合物の純度は特に限定されることはないが、純度55質量%以上のものを使用することが好ましい。

【 0 0 1 9 】

本発明における固相抽出用充填剤は、少なくとも疎水性単量体（A）を含む単量体を重合して得られた粒子にイオン交換性基が導入されたものであり、さらにイオン性物質の充填剤表面への接近性を向上しイオン交換作用をより円滑に行うためには、疎水性単量体（A）及び親水性単量体（B）を共重合し親水性を付与することが好ましい。

【 0 0 2 0 】

本発明における親水性単量体（B）として極性基を持ち親水性が付与できる共重合可能な単量体であれば特に限定されるものではないが、一例をあげればN-ビニルカルボン酸アミドから選ばれ、N-ビニルホルムアミド、N-ビニルアセトアミド、N-ビニルプロピオンアミド、N-（プロペニル-2-イル）ホルム

アミド、N-（プロペニル-2-イル）アセトアミド、N-ビニル-2-ピロリドンが用いられ、これらの中でも親水性、反応の操作性の点でもN-ビニルアセトアミドまたはN-ビニル-2-ピロリドンが好ましく用いられる。

【0021】

N-ビニルアセトアミドまたはN-ビニル-2-ピロリドンは単量体総量に対して5～60質量%、好ましくは5～30質量%使用される。N-ビニルアセトアミドまたはN-ビニル-2-ピロリドンの量が単量体総量に対して5質量%以下の場合には親水的性質が発現できないため好ましくなく、60質量%を超えると架橋性単量体の比率が低下し膨潤度が大きくなるため好ましくない。

【0022】

本発明の固相抽出用充填剤は、疎水的性質を損なうことの無いように、親水性単量体の部位にイオン交換基が導入されたものであり、イオン交換基が導入のために、さらに親水性単量体（B）として水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルが用いられる。水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルとして2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、2-ヒドロキシプロピル（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールジ（メタ）アクリレート、ペンタエリスリトールトリ（メタ）アクリレート、グリセリンモノ（メタ）アクリレート、グリセリンジ（メタ）アクリレートを挙げることができ、反応性、反応時の操作性、さらに生成した共重合体粒子の膨純度を考慮するとグリセリンジ（メタ）アクリレートをを用いるのが好ましい。

【0023】

これら水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルは単量体総量に対して10質量%以上、好ましくは20～25質量%含有することが好ましい。水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルの量が10質量%以下の場合にはイオン交換基を共有結合するための水酸基の比率が少なく、十分なイオン交換基の導入ができなくなるため好ましくない。

【0024】

本発明の固相抽出用充填剤は多孔性であり、その多孔性を付与する目的で単量体混合物に希釈剤を添加し重合される。用いる希釈剤としては、単量体混合物に

溶解するが重合反応には不活性で、さらに生成した共重合体を溶解しない性質の有機溶媒が使用可能である。

【 0 0 2 5 】

例えば、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、ジエチルベンゼンのような芳香族炭化水素類；ヘキサン、ヘプタン、オクタン、デカンのような飽和炭化水素類；イソアミルアルコール、ヘキシルアルコール、オクチルアルコール、2-エチルヘキシルアルコールのようなアルコール類；ジクロロメタン、ジクロロエタン、トリクロロエタンのような脂肪族ハロゲン化炭化水素類；酢酸エチル、酢酸ブチル、フタル酸ジメチル、フタル酸ジエチルのような脂肪族あるいは芳香族エステル類；トリアセチン、トリブチリン、トリカプリンのようなグリセリントリエステル類などが挙げられる。これらの希釈剤として用いる有機溶媒は単独または2種類以上混合して使用することができる。

これら希釈剤の添加量は疎水性単量体（A）及び親水性単量体（B）の総量に対して10～300質量%であることが好ましい。

【 0 0 2 6 】

本発明の共重合体粒子は適当な分散安定剤を含んだ水性媒体中で懸濁重合の方法によって製造されるが、この場合用いられる重合開始剤は、ラジカルを発生する公知のラジカル重合開始剤であれば特に限定されることはなく、一例をあげれば、2,2'-アゾビスイソブチロニトリル、2,2'-アゾビス（2,4-ジメチルバレロニトリル）のようなアゾ系開始剤をあげることができる。重合開始剤の濃度は単量体に対して0.1～5質量%が好ましい。

【 0 0 2 7 】

本発明における重合反応は適当な分散安定剤を含んだ水性媒体中で攪拌して希釈剤を含む単量体溶媒を懸濁させて重合させる懸濁重合の方法を適用することができる。分散安定剤としては、公知のものが使用することができ、通常、ゼラチン、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメルセルロースなどの水溶性高分子化合物が用いられる。分散安定剤の濃度としては、水性媒体に対して0.1～5質量%が好ましい。水性媒体は水を主体とする媒体であり、水のほかに塩類その他の水溶性成分が溶解し

ていてもよい。

【0028】

重合反応は、水性媒体中への単量体類の溶解を抑制する目的で、水性媒体中に塩類を溶解して反応させることが好ましい。このような塩類としては、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、硫酸ナトリウムなど一般に用いられるものが挙げられる。

【0029】

N-ビニルカルボン酸アミドは水への溶解性が高いので、溶解を抑制するためには塩類を高濃度で使用することが好ましい。使用する塩類及びその濃度は特に限定されるものではないが、使用する塩類により溶解度に違いがあるため、水性媒体中に対して例えば塩化ナトリウムであれば0.1～15質量%さらに塩化カルシウムであれば1～40質量%溶解して使用することが好ましい。

【0030】

分散安定剤及び塩類を含んだ水性分散媒相と、疎水性単量体(A)及び親水性単量体(B)を含む単量体混合物を希釈剤と混合し重合開始剤を溶解させた有機溶媒相との重量比(液比)は、N-ビニルカルボン酸アミドが水への溶解性が高いため、水性分散媒相へ分配するために収率が低下する。また液比が小さすぎると有機溶媒相の懸濁分散が不安定になる。このため水性分散相対有機溶媒相の液比は、2:1～10:1が好ましい。

【0031】

重合反応は窒素置換後、通常の攪拌下で40～100℃に加熱し、大気圧下で5～16時間反応を行う。攪拌により前記有機溶媒層は球状の粒子となって水性媒体中に分散し反応が進行する。このときそれぞれの粒子は希釈剤を含んだ状態で重合が行われ、重合体が網状に成長するため、あとで希釈剤を除去すると、多孔性の粒子が得られる。

【0032】

反応後の粒子の分離は濾過等によって容易に分離することができ、また希釈剤の除去は、アセトン、メタノールのような溶媒で洗浄後乾燥することによって容易に行うことができる。このようにして得られた、固相抽出用充填剤は粒径が1

～200 μm 、好ましくは1～100 μm 、より好ましくは10～70 μm に分級しイオン交換基を導入するための充填剤とする。固相抽出用充填剤の粒径が1 μm より小さい場合はゲルの流出を防止するフィルターまたはフリットを通過してしまうため好ましくなく、一方200 μm より大きい場合は単位重量あたりの比表面積が少なくなり吸着量が減少するため好ましくない。

【0033】

本発明の固相抽出用充填剤は疎水性単量体（A）から生成した疎水性部位の性質を損なうことなく、親水性単量体（B）から生成した親水性部位へイオン交換基を導入し疎水性とイオン交換性を併せ持つ固相抽出用充填剤である。

化学修飾されるイオン交換基は特に限定されるものではないが、陽イオン交換基としてはスルホ基、カルボキシル基が挙げられる。特に広いpH領域で解離し、イオン交換能を発揮する点からスルホ基が好ましい。

【0034】

陰イオン交換基としては4級アンモニウム基、1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、1級アミノ基及び2級アミノ基の混在型が挙げられるが、広いpH領域で解離し、イオン交換能を発揮する点から4級アンモニウム基が好ましい。

【0035】

イオン交換性の導入は親水性単量体（B）の水酸基を持つ多価アルコールの（メタ）アクリル酸エステルから導入された水酸基に化学的結合することによって行われる。化学結合の方法は特に限定されるものではなく、例えば水酸基に直接反応する方法として、プロパンスルトンを反応させスルホ基を共有結合する方法、グリシジルトリメチルアンモニウムクロライドのような4級アンモニウム基とエポキシ基を持つ化合物を直接反応させることにより4級アンモニウム基を共有結合する方法等が挙げられる。

【0036】

また水酸基にエピクロロヒドリンまたは1，4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、エチレングリコールジグリシジルエーテル、グリセリンジグリシジルエーテルのようなグリシジル基を分子内に2個持つ化合物を反応させエポキシ基

を導入し、そのエポキシ基に反応させることによってイオン交換基を共有結合することができる。

【 0 0 3 7 】

例えば、エポキシ基を導入した充填剤にトリメチルアミン、トリエチルアミン、トリブチルアミン等を反応させることにより4級アンモニウム基を、また無水亜硫酸ナトリウムのような無機塩を反応させることによりスルホ基を共有結合する方法を挙げることができる。

【 0 0 3 8 】

試薬の安全性、入手の容易さの点等からエポキシ基を導入した後イオン交換基を共有結合することが好ましく、4級アンモニウム基であれば、充填剤1乾燥グラムに対して5 μ 当量以上が好ましく、また、スルホ基であれば、充填剤1乾燥グラムに対して20 μ 当量以上が好ましい。これら好ましい値以下のイオン交換量の場合イオン交換作用が十分に発揮されないので好ましくない。

【 0 0 3 9 】

本発明の固相抽出用充填剤は、微量成分の濃縮、夾雑物の除去などに幅広く応用可能であり、充填装置、例えばカラムまたはカートリッジ等のリザーバーに充填して用いることができる。

【 0 0 4 0 】

固相抽出法は固相抽出用として作成された充填剤を充填装置（カラムまたはカートリッジにおいてリザーバーと呼ばれる容器）に充填され使用されるものであるが、カラム、カートリッジ、またはリザーバー等充填装置の容器の形状及び材質は、固相抽出操作中に容器が使用する有機溶媒に不溶性でありさらに容器自身より不純物の溶出がなければ特に限定されない。

【 0 0 4 1 】

本発明においてカートリッジとは、内径2～6mm ϕ 、長さ10～30mmの円筒状で両端をフリットまたはフィルターを入れ充填剤の流出を防止し、フリットまたはフィルターは中心に0.1～1mm ϕ の穴のあいたキャップによって留められているものを意味する。カートリッジ単独では液を流すために必要な接続コネクターを持たないので専用のカートリッジホルダー、ガードホルダーまたは

ホルダーと呼ばれるリザーバー容器に装着して用いる。

【0042】

さらにカラムは、内径2～6mm ϕ 、長さ10～50mmの円筒状で両端をエンドフィッティングで留めているものである。エンドフィッティングには充填剤流出防止のためのフリットまたはフィルターと共に接続コネクターを持つので、直接接続し液を流すことができるのものを意味する。

【0043】

これらカートリッジ及びカラムの材質として例えば、ステンレス、ガラスのような無機材質、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエーテルエーテルケトンのような合成樹脂材質等が挙げられ、特に使用の簡便性、価格などを考慮するとポリエチレン製のものが好ましく、容積1～200mL好ましくは1～100mLの注射器型等が挙げられる。

【0044】

固相抽出用カラムまたはカートリッジは固相抽出操作中に充填剤が溶出しない様にカラムまたはカートリッジの両端にフィルターまたはフリットと呼ばれる5～200 μ m好ましくは10～50 μ mの板状多孔性の物をセットして用いるが、フィルターまたはフリットの材質は特に限定される物ではない。たとえば、ステンレス、ガラス、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン製のものを挙げることができるが、価格、操作性の点等からポリエチレン製のものが好ましい。

【0045】

固相抽出用充填剤のカラムまたはカートリッジのリザーバーへの充填量は粒子の嵩密度、試料の濃縮量によって異なるが、通常、3mLのそれぞれの容積に対し30～500mg好ましくは50～300mgである。

【0046】

本発明の固相抽出用充填剤及び固相抽出用カラムまたはカートリッジ等の固相抽出用充填装置は、カラムスイッチング法を用いる試料前処理方法にも適応することができる。

カラムスイッチング方法には種々の方法があるが、一例をあげれば、まず固相抽出用カラムまたはカートリッジを分析用カラムの前に取り付け、この固相抽出

用カラムまたはカートリッジで共存する夾雑物を吸着して必要な分画のみを分析用カラムに送り込み分析を続けている間にバルブを切り替え別の溶離液で前処理用固相抽出用カラムまたはカートリッジを洗浄する方法、逆に、必要な分画のみを固相抽出用カラムまたはカートリッジにいったん吸着させて妨害成分が流出した後、バルブを切り替え、改めて別の溶離液によって吸着成分を分析カラムに導く方法等が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

本発明の固相抽出用充填剤が充填されてなるカラムまたはカートリッジ等の充填装置の使用用途に特に限定はないが、固相抽出用充填剤の性質上、環境関連試料、医薬関連試料等の分析処理の際に、微量含有する希薄な目的物質を濃縮する目的及び／または共存する夾雑物を容易に除去する目的等で用いることができる。さらに具体的には河川中の農薬等有害物質の測定、農作物中の残留農薬の測定、血清中の薬物の測定等に好適に用いられる。

【 0 0 4 8 】

本発明の環境または医薬関連試料の処理方法は、上記充填剤及び／または上記固相抽出用カラムまたは固相抽出用カートリッジ等の固相抽出用充填装置を用いて目的成分を抽出する固相抽出方法である。本発明の処理方法は、各種試料の分析の際に、微量含有する希薄な目的物質を濃縮、及び／または共存する夾雑物を除去するものであり、各種分析時の前処理及び／または後処理としても応用できるものである。さらに本発明の充填剤、固相抽出用カラムまたは固相抽出用カートリッジは、血清中の薬物試料の同定または定量を目的とした測定に好適に用いられる。

【 0 0 4 9 】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。

【 0 0 5 0 】

実施例 1

（イオン交換基導入を目的とした充填剤の重合）

N-ビニル-2-ピロリドン（和光純薬工業株式会社製）15.00 gを純度81%のジビニルベンゼン（三共化成株式会社製 DVB-H）45.00 g、グリセリンジメタクリレート（新中村化学工業株式会社製 NKエステル1G）15.00 gのモノマー相とトルエン（和光純薬工業株式会社製）30.28 g、2-エチルヘキシルアルコール（和光純薬工業株式会社製）10.10 gの希釈剤相の混合液に溶解し、次いで2, 2'-アゾビス（2, 4-ジメチルバレロニトリル）2.00 gを溶解して油層を調整した。

【0051】

脱イオン水286 mLに塩化カルシウム103.5 g、塩化ナトリウム10.35 gを溶解し塩溶液を作成する。続いて脱イオン水100 mLにポリビニルアルコール（クラレ株式会社製 クラレポバールPVA-224）4 g、塩化ナトリウム4 gを溶解した液から86 mL取り塩溶液へ加える。更に10 mLの脱イオン水に6.4 mgの亜硝酸ナトリウムを溶解した液から7 mL取り、塩溶液に加える。この様に調整した塩溶液を水層とする。

【0052】

油層と水層を混合しエクセルオートホモジナイザー（株式会社 日本精機製作所製）を用い5分間1800 rpmの高速攪拌することにより油滴を20~100 μ mに調整した後、1 Lセパラブルフラスコに移し、水浴中で窒素ガス雰囲気下毎分100 rpmにて攪拌しながら70℃へ昇温して6時間反応を行った。冷却後、生成した共重合体粒子はNO. 101の濾紙により濾別した後、脱イオン水2 L、更にアセトン2 Lで洗浄した後ステンレス製バット上に広げ風乾し、更に60℃で16時間減圧乾燥した。得られた共重合体粒子を風力分級装置（NIPPON PNEUMATIC MFG社製MINI. CLASSIFIER）で40~70 μ mに分級しイオン交換基を導入するための充填剤とした。

【0053】

（エポキシ基の導入）

40~70 μ mに分級されたイオン交換基を導入するための充填剤粒子10.00 gを攪拌装置の付いた200 mLのセパラブルフラスコに入れ、エピクロロヒドリン（東京化成工業株式会社製）20 mL加え攪拌した後、2 Nに調整した

水酸化ナトリウム（和光純薬工業株式会社製）溶液 6 0 m L を加え攪拌しながら 5 0 ℃ へ昇温し 3 時間反応を行なった。冷却後エポキシ基を導入された粒子は N O . 1 0 1 の濾紙により濾別した後、脱イオン水 5 0 0 m L 、更にアセトン 5 0 0 m L で洗浄した後ステンレス製バット上に広げ風乾した。

【 0 0 5 4 】

（ 4 級アンモニウム基の導入）

エポキシ基の導入された粒子 5 . 0 0 g を攪拌装置の付いた 1 0 0 m L のセパラルフラスコに入れジオキサン（和光純薬工業株式会社製） 3 0 m L を加え攪拌した後、トリエチルアミン（国産化学株式会社製）を 1 0 m L 加え攪拌しながら 8 0 ℃ へ昇温し 8 時間反応を行なった。冷却後 4 級アンモニウム基を導入された粒子は N O . 1 0 1 の濾紙により濾別した後、アセトン 5 0 0 m L 、更に脱イオン水 5 0 0 m L で洗浄した後ステンレス製バット上に広げ風乾した。

この粒子のイオン交換容量を測定した結果、1 乾燥 g 当たり 1 0 . 9 μ 当量であった。

【 0 0 5 5 】

（スルホ基の導入）

エポキシ基の導入された粒子 5 . 0 0 g を攪拌装置の付いた 1 0 0 m L のセパラルフラスコに入れ脱イオン水 2 5 m L を加え攪拌した後、無水亜硫酸ナトリウム（国産化学株式会社製）を 6 . 5 g 加え攪拌しながら 7 0 ℃ へ昇温し 6 時間反応を行なった。冷却後スルホ基を導入された粒子は N O . 1 0 1 の濾紙により濾別した後、脱イオン水 5 0 0 m L 、更にアセトン 5 0 0 m L で洗浄した後、ステンレス製バット上に広げ風乾した。

この粒子のイオン交換容量を測定した結果、1 乾燥 g 当たり 4 3 . 7 μ 当量であった。

また、この共重合体粒子の表面積は 6 3 5 m² / g であった。

【 0 0 5 6 】

（固相抽出による回収率測定）

4 0 ~ 7 0 μ m に分級されたスルホ基が導入された固相抽出用充填剤粒子 2 5 0 m g を 3 m L のリザーバーに充填し、固相抽出用カートリッジとし以下の手順

で回収率測定を行った。

【0057】

- (1) 固相抽出用カートリッジを、吸引マニホールドにセットする。
- (2) メタノール5 mLを、5 mL/minで通液する。
- (3) 脱イオン水5 mLを、5 mL/minで通液する。
- (4) 濃縮用試料として0.25 ppmに調整された試料100 mLを、5 mL/minで通液し試料を固相抽出用カートリッジ中に濃縮（吸着）させる。
- (5) 0.1 N塩酸5 mLを、5 mL/minで通液する。
- (6) メタノール5 mLを、5 mL/minで通液し溶出液を回収する。
- (7) 回収した溶出液から20 μ Lを採取し高速液体クロマトグラフ装置により分析しその面積値を求める。
- (8) 濃縮用試料に使用したものと同一物質を標準試料として5 ppmに調整した試料20 μ Lを高速液体クロマトグラフ装置により分析しその面積値を求める。
- (9) 濃縮試料の面積値／標準試料の面積値で回収率を求める。

【0058】

共重合体の濃縮能力が弱いと試料が共重合体に吸着されず回収率が低下する。回収率測定の結果を表1に示すが、回収率は85%以上あり試料濃縮力に優れた固相抽出用充填剤であることが分かった。

【0059】

(比較例1)

実施例と同様に重合、洗浄し、40～70 μ mに分級したイオン交換能の無い充填剤を用い同様の方法で固相抽出を行なった結果を表1に示す。このイオン交換能のない固相抽出用充填剤は、塩基性物質の回収率が低く試料濃縮力の劣る充填剤であることが分った。

【0060】

【表 1】

	回収率 (%)	
	実施例 1	比較例 1
カフェイン	96.7	98.7
プロプラノロール	92.8	81.4
プロカインアミド	91.0	73.6

【0061】

高速液体クロマトグラフ測定条件

カラム：Shodex C18-5A (4.6mm ϕ ×150mm)

移動相：アセトニトリル／100mMリン酸緩衝液＝20／80 (V／V)

流速：1.0mL／min

検出器：紫外吸収検出器

測定波長：UV254nm

試料注入量：20 μ L

【0062】

【発明の効果】

本発明の固相抽出用充填剤は、従来の充填剤においては考えられることのなかった充填剤の疎水性部位を損なうことなくイオン交換性部位を導入し両性質を併せ持つことにより、疎水性物質とイオン性物質の回収率の優れた充填剤であり、特に環境関連、医薬関連試料等に微量含有する希薄な目的物質を容易に濃縮すると共に、共存する夾雑物を容易に除去することができ、各種の分析を精度良く、容易に行なうことができるため、河川中の農薬等有害物質の測定、農作物中の残留農薬の測定、血清中の薬物測定等の幅広い分野に有効である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】疎水性とイオン交換基を併せ持つことで、疎水性物質のみならずイオン性物質にも回収率の優れた固相抽出用充填剤それを用いた固相抽出方法、それを用いた充填装置及び試料の処理方法を提供すること。

【解決手段】疎水性単量体（A）と親水性単量体（B）を共重合することにより得られた粒子にイオン交換基を導入し、疎水的部位を損なうことなくイオン交換基を導入された粒子であることを特徴とする固相抽出用充填剤、固相抽出方法、固相抽出用充填装置、及びそれを用いた試料の処理方法に関する。

特 2000-165473

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2000-165473
受付番号	50000685967
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成12年 6月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成12年 6月 2日
-------	-------------

次頁無

特2000-165473

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002004]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都港区芝大門1丁目13番9号
氏 名	昭和電工株式会社